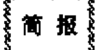
动 物 学 研 究 2002, Jun. 23 (3): 253 ~ 258　　CN 53 - 1040/Q　ISSN 0254 - 5853
Zoological Research



Agrotis segetum 雄蛾触角叶神经元对性信息素时间编码的机制分析

项　辉[1], Sylvia ANTON[2], Bill S. HANSSON[2]

(1. 中山大学 生命科学学院，广东 广州　510275;
2. Department of Ecology, Lund University, Lund, s22362, Sweden)

摘要：应用压力注射，在 *Agrotis segetum* 雄蛾触角叶（AL）中 33 个对性信息素有反应的 MGC 神经元上探讨了对性信息素反应模式的形成机制。压力注射 100 mmol/L GABA 进入 AL 神经网引起神经元一个慢的超极化电位，并有一个长时程的放电抑制相，与用性信息素刺激诱导的神经元反应很相似，但 GABA 并不影响神经元对性信息素刺激的去极化反应。低 Cl^- 溶液可减弱 AL 神经元对性信息素刺激的超极化反应，甚至使超极化相逆转为兴奋反应，抑制相消失。压力注射 Bicuculline 使神经元放电频率增加。压力注射 Bicuculline 的同时给予性信息素刺激，可使性信息素刺激所致的神经元放电增加进一步加强；Bicuculline 可使性信息素刺激引起的神经元超极化幅度变小、放电抑制时间变短，甚至其抑制相完全被逆转为正常放电，无超极化反应和抑制相存在。结果表明，AL 神经元对性信息素反应的超极化相与 GABA 受体有关。

关键词：触角叶神经元；性信息素；GABA 受体；Bicuculline；时间编码；机制分析
中图分类号：Q969.436.4；Q42；Q434　**文献标识码**：A　**文章编号**：0254 - 5853(2002)03 - 0253 - 06

Mechanism of the Biphasic Pattern of Neurons Time Coding to Sex Pheromone in the Antennal Lobe of the Male Moth *Agrotis segetum*

Xiang Hui[1], Sylvia ANTON[2], Bill S. HANSSON[2]

(1. *Life Sciences School, Zhongshan University, Guangzhou* 510275, *China*;
2. *Department of Ecology, Lund University, Lund*, s22362, *Sweden*)

Abstract: Here studied the mechanism of responded pattern of 33 neurons to sex pheromone in the antennal lobe (AL) of male moths *Agrotis segetum*. Pressure injecting 100 mmol/L GABA into AL, GABA can elicit inhibitory responses of slow hyperpolarization and long time inhibition of background spiking, alike which caused by sex pheromone in the same neuron. But GABA can not act on the excitation evoked by pheromone. Low-Cl^- saline caused that the IPSP to reverse the hyperpolarization, excitation evoked by pheromone was prolonged, and the distinct separation between bursts disappeared. Bicuculline was as a $GABA_A$ receptor antagonist in vertebrates, and a water-soluble form of this agent was used for pressure ejection into the AL neuropil. Bicuculline increased the spike frequency in tested neurons, even strengthened the excitation phase acted by pheromone, and the hyperpolarization and spike-inhibition produced by pheromone was replaced by excitation. The effect was reversible by washing in normal saline. Results indicate that the hyperpolarization is related to GABA receptor, which responds to the sex pheromone in AL neurons in the male motha *Agrotis segetum*.

Key words: Antennal lobe neurons; Pheromone; GABA receptor; Bicuculline; Time coding; Mechanism analyse

收稿日期：2001 - 10 - 16；接受日期：2002 - 02 - 21

昆虫的触角叶（antennal lobe，AL）作为初级嗅处理中枢，由许多球状神经网（glomeruli）组成。雄蛾的触角叶中有巨球复合体（macroglomerular complex，MGC），专一性处理性信息素信息；在这里嗅感受神经元（olfactory receptor neurons，ORN），局部中间神经元（local interneurons，LN）和投射神经元（projection neurons，PN）相互之间形成突触连接，对信息进行初步的处理并换元，由PN向更高一级中枢传递（Hansson & Anton，2000）。在 *A. segetum* 的MGC中，对性信息素刺激起反应的神经元，先有一个去极化相，随后跟着一个超极化相，呈现一种双相反应模式（Lei & Hansson，1999）。PN的反应模式是由ORN、LN与PN之间的突触组织特点决定的，LN的特征决定了PN反应模式有抑制相的存在（Christensen *et al.*，1998）。很多被研究的昆虫中，LN是一种γ氨基丁酸（gamma-amino butyric acid，GABA）能的神经元，GABA似乎是LN的主要神经递质（Waldrop *et al.*，1987），GABA及其激动剂和拮抗剂会影响到PN的反应模式。本研究企图了解在 *A. segetum* 中MGC的PN这种双相反应模式形成的机理。

1 材料和方法

1.1 动 物

1～3天龄的雄蛾 *A. segetum* 由Lund大学生态系实验室培育。动物的固定及解剖见项辉等（2001）。暴露的脑用生理溶液灌流（Christensen & Hildebrand，1987），正常生理溶液成分包含（mmol/L）：149.9 NaCl，3.0 KCl，3.0 $CaCl_2$，10.0 N-tris（hydroxymethyl）methyl-2-aminoethanesulfonic acid（TES），25.0 葡萄糖；调pH 6.9。低氯溶液中用部分 SO_4^{2-} 代替 Cl^-，其组成为（mmol/L）：112.4 NaCl，18.7 Na_2SO_4，3.0 KCl，3.0 $CaCl_2$，10.0 TES，43.7 葡萄糖；调pH 6.9，Cl^- 浓度比正常生理溶液低24%（Waldrop，1987）。

1.2 性信息素刺激和MGC神经元细胞内电生理记录

经碳粉过滤的空气流经500 mL蒸馏水瓶以保持湿润，速度为0.5 m/s，太大会产生明显的机械刺激反应；经内径为8 mm的玻璃管传送到触角，玻璃管口距触角约10 mm。刺激物性信息素的4种单一成分（Z5-10：Oac，Z5-12：Oac，Z7-12：Oac，和Z9-14：Oac），及含4种成分的混合物溶解在重蒸的己烷中，分别按10 ng重量吸取溶液10 μL（性信息素浓度为1 ng/μL）于5 mm×15 mm的滤纸片上。将含性信息素的滤纸片分别放入Pasteur玻璃管中，做好标记；重蒸己烷作空白对照管。把内有滤纸片的Pasteur玻璃管插入空气流玻璃管中，插入位置距触角约150 mm。Pasteur玻璃管由嗅刺激器（SYNTECH，Hilversum，The Netherlands）控制，以5 mL/s给出单个或一定频率的连续5个刺激。记录用玻璃微电极接触到MGC神经元后，用500 ms性信息素单刺激来验证神经元反应特性，选择对性信息素混合物或某一成分起反应的神经元继续进行实验。玻璃微电极用Sutter P-87微电极拉制器拉制。神经活动经示波器（Gould）观察并用录相机记录在录相带上以便于进一步分析。

1.3 压力注射系统

作压力注射用的单管玻璃微电极（1.5 mm外径，1.17 mm内径，ClARK ELECTROMEDICAL INSTRUMENTS）尖端内径约20 μm，用微电极拉制器拉制。电极拉好后置于显微镜下检查，合乎直径要求的电极用于实验。将工具试剂GABA、Bicuculline及对照用生理溶液分别灌入不同的压力注射玻璃微电极中，电极尖端插入AL，另一端连接压力注射控制器（Picospritzer，General Valve Corp.）。注射压力（13 p.s.i）及时间（20～200 ms）由压力注射控制器操纵，电极的直径、注射压力和注射持续时间经反复实验确定，不能由压力注射过程产生伪迹，实验中注意在MGC范围内尽量使压力注射电极和记录电极之间的距离最大。GABA及Bicuculline methochlorde溶于无糖生理溶液中，均为100 mmol/L，剂量大小由注射时间控制。实验时先放置压力电极，再插记录电极。

1.4 数据处理

将实验记录的录相带放入录象机中播放，电脑采集信息，所用系统为AUTOSPIKE（SYNTECH）。在MGC中对性信息素有反应的神经元，可计算给刺激后一定时间内的放电数，如给予5个连续刺激，则计算5个刺激的平均值。同时计算性信息素反应前后神经元的放电频率。在MGC中对性信息素反应的PN呈现这样一种模式：每个刺激引起一个放电爆发过程即去极化相，随后跟着一个抑制过程即超极化相。对这种反应模式的神经元，通常测

量如下反应参数：在去极化相一定时间内的放电脉冲个数；超极化相内的超极化电位幅度，放电抑制时间。结果作 t 检验。

2 结　果

本实验在 33 个对性信息素有反应的 MGC 神经元上进行。这些神经元都对性信息素某种或某几种成分或混合物有较强的反应，其峰电位幅度差不多都超过 50 mV，神经元自发放电频率在 6～50 Hz 范围内。其中 5 个神经元显示对溶剂己烷和性信息素均有反应。神经元对性信息素某单一成分或混合物的反应都呈现一种双相反应模式。

2.1　GABA 对 MGC 中神经元电活动的影响

在 8 个神经元上，我们观察了压力注射 100 mmol/L GABA 进入 AL 神经网对 MGC 神经元的影响。在其中 4 个神经元，1 次 60～80 ms 的 100 mmol/L GABA 压力注射引起一个慢的超极化电位，并有一个长时程的放电抑制相（图 1A），这与用性信息素刺激诱导的神经元反应很相似；在其中 2 个神经元，1 次 60～80 ms 的 GABA 压力注射，引起一个快的超极化电位，并有长时程的放电抑制（图 1B）；在另外 2 个神经元上只观察到放电抑制过程，但没有明显的超极化电位存在，这很可能与压力注射电极和记录电极之间的距离有关。实验过程发现 40 ms GABA 先只引起抑制放电反应，而加大到 80 ms GABA 就诱导出一个超极化电位。图 1C 显示压力注射 GABA 同时给予性信息素刺激的结果，实验时曾将 GABA 的注射时间延长到 200 ms，结果显示 GABA 不抑制性信息素刺激引起的神经元去极化反应，而且实验的 6 个神经元结果一致。这提示 ORN 将嗅觉信息传递到 PN，引起 PN 兴奋的过程（即去极化相）与 GABA 受体无关，也说明信息从 ORN 到 PN 并没有经过一个 GABA 能的 LN 来中转。

2.2　低 Cl^- 溶液影响 MGC 神经元对性信息素刺激的反应

在 6 个 MGC 神经元上，通过降低 Cl^- 浓度以改变 Cl^- 平衡电位来观察 Cl^- 是否参与神经元对性信息素刺激的超极化反应。先在正常生理溶液灌流情况下，测试神经元对性信息素 1 Hz 刺激的频率反应，然后调至低 Cl^- 生理溶液灌流，测试神经元对性信息素刺激的反应，作用一段时间再换成正常溶液，观察神经元的恢复情况。低 Cl^- 溶液可抑制 MGC 神经元对性信息素刺激的超极化反应，甚至

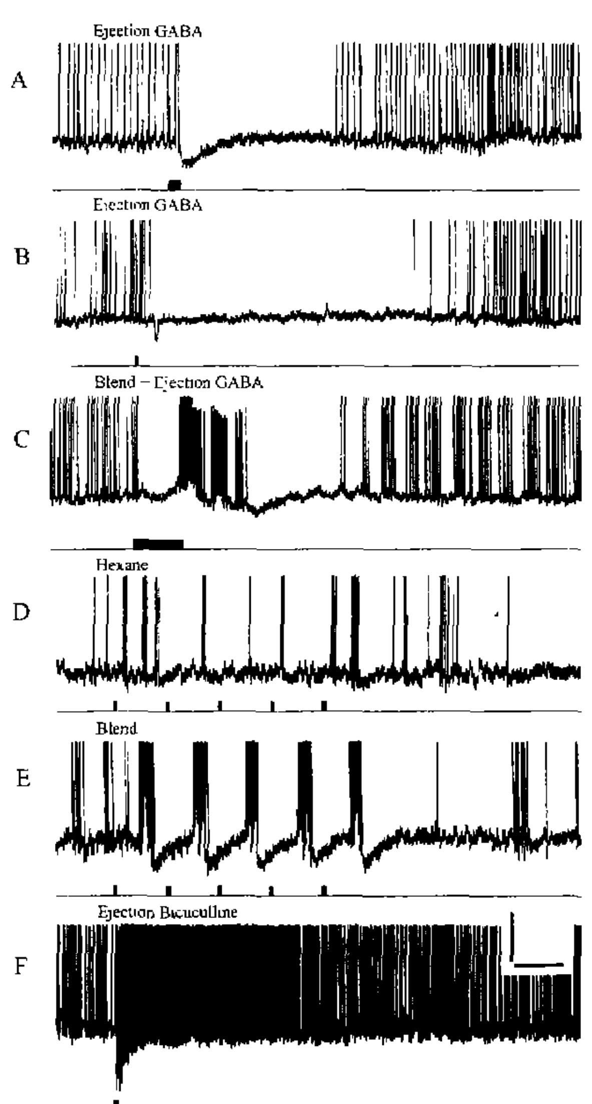


图 1　压力注射 GABA 或 GABA 受体拮抗剂 Bicuculline 入 AL 神经网对神经元特性的影响

Fig.1　Responses of antennal lobe neurons to pressure ejection of GABA or Bicuculline into the antennal lobe neuropil

A. GABA 引起神经元 A 慢的超极化电位；B. GABA 引起神经元 B 快的超极化电位；C. 同时给予性信息素刺激，GABA 不能抑制神经元 C 对性信息素刺激的兴奋反应；D－F. 同一神经元，D、E 为对照，F 显示 GABA 拮抗剂 Bicuculline 对神经元活动的影响。横标 = 500 ms，纵标 = 25 mV。

A. In neuron A, GABA evoked a slow hyperpolarization and followed by long spike-inhibition; B. In neuron B, GABA evoked a rapid hyperpolarization and followed by long spike-inhibition; C. In neuron C, GABA can not act on the excitation evoked by pheromone; D-F. In neuron F (D and E as control), pressure ejection of Bicuculline were used for resulting in spikes increase of neuron. Horizontal bar = 500 ms, vertical bar = 25 mV.

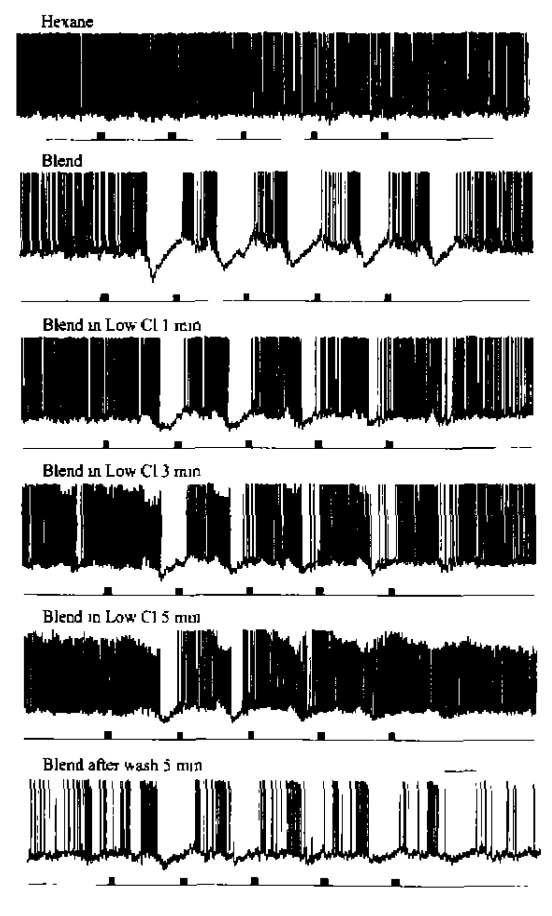


图 2 低 Cl⁻离子在 AL 神经元对性信息素复合物刺激反应中的作用

Fig.2 A antennal lobe neuron responses to 4-component blend in normal, low-Cl⁻, and normal saline

横标 = 400 ms，纵标 = 20 mV。

Horizontal bar = 400 ms, vertical bar = 20 mV.

使神经元超极化时的抑制反应逆转为兴奋反应。当恢复正常生理溶液灌流，神经元对性信息素刺激的超极化反应有部分恢复，抑制相明显出现。如图 2 所示。

2.3 GABA 受体拮抗剂 Bicuculline 影响 MGC 神经元对性信息素的反应

本实验用水溶性的 Bicuculline methochlorde 和不含糖的生理溶液配制成 100 mmol/L GABA 受体拮抗剂 Bicuculline，压力注射入 AL 神经网中。Bicuculline 会使神经元放电频率增加（图 1：D～F）。当压力注射 Bicuculline 的同时给予性信息素刺激，在性信息素诱导的神经元去极化相内，Bicuculline 可使信息素刺激所致的神经元放电增加进一步增强；对性信息素刺激所引起的神经元超极化反应来说，Bicuculline 可使性信息素刺激引起的神经元超极化幅度变小、放电抑制时间变短，甚至其抑制相完全被逆转变为去极化，无超极化反应和抑制相存在（图 3）。统计结果如表 1。在压力注射 GABA 和 Bicuculline 的实验中，都用了压力注射正常生理溶液作为对照，压力注射生理溶液入 AL 神经网中，没有改变神经元放电频率，在神经元对性信息素的反应方面也没有影响。

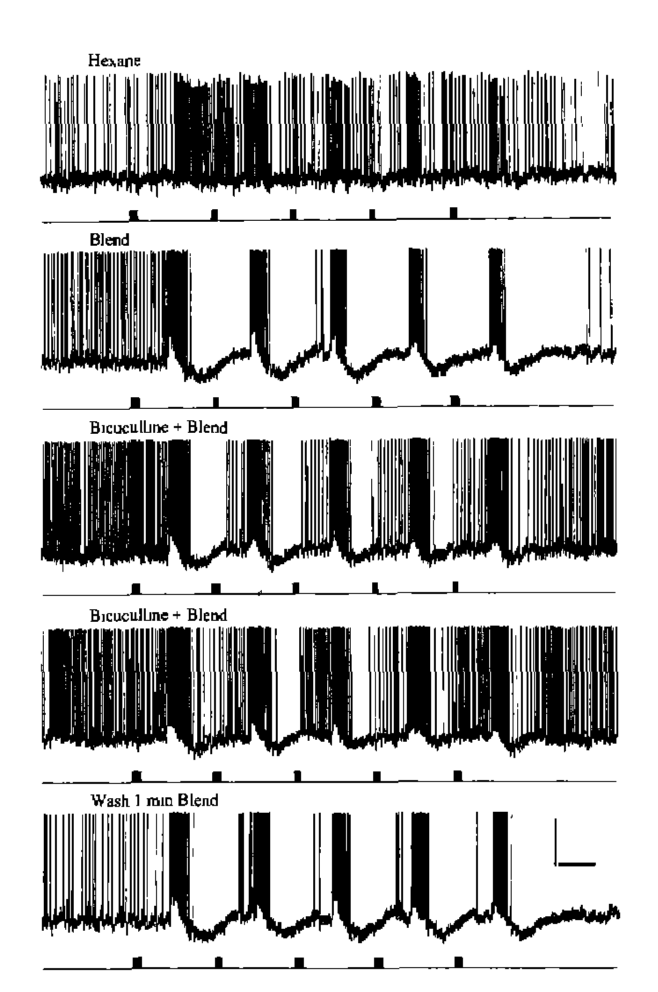


图 3 GABA 受体拮抗剂 Bicuculline 在 AL 神经元对性信息素频率刺激反应中的作用

Fig.3 Effect of Bicuculline on the response pattern evoked by pulsed 4-component blend in the antennal lobe neuron

性信息素刺激引起的神经元超极化反应和峰值的抑制被兴奋替代，该作用经生理溶液冲洗后可逆转。横标 = 500 ms，纵标 = 25 mV。

The hyperpolarization and spike-inhibition produced by pheromone was replaced by excitation, this effect was reversible by washing in normal saline. Horizontal bar = 500 ms, vertical bar = 25 mV.

3 讨　论

行为实验表明，性信息素的断续刺激对维持雄蛾寻找性信息素源的逆风飞行（upwind flight）或散步似（walking）行为是必要的。不间断持续的性信息素刺激，雄蛾会停止逆风飞行，而代之以沿着性信息素方向交叉飞行（across-wind flight）。自然情况下雄蛾寻找性信息素源的行为一般呈现出逆风飞行伴随交叉飞行。当给性信息素断续刺激频率高于 5 Hz 时，雄蛾几乎是向性信息素源直线飞行。性信息素的断续刺激具有一定的频率，雄蛾触角 ORN 能模拟刺激频率的时相模式。在 AL 中，ORN 或直接或经 LN 与 PN 形成突触，把信息传递给 PN。PN 的时相反应模式很大程度上依赖于传入的时相模式，其频率几乎完全由传入的频率来决定。但因为有 LN 的参与，就有了 PN 反应抑制相的存在，而 ORN、LN 与 PN 之间不同的突触模式使 PN 表现出不同的时间编码特点（Christensen *et al*.，1998）。在 *Manduca sexta*，PN 呈现一种三相反应模式，而在 *A. segetum*，PN 表现的是双相反应。

GABA 是脊椎动物和无脊椎动物神经系统中的抑制性神经递质。脊椎动物的 GABA 受体有几种亚型，$GABA_A$ 受体通过 Cl^- 通道介导抑制反应，其拮抗剂为 Picrotoxin 和 Bicuculline；$GABA_B$ 受体通过功能性耦联 K^+ 或 Ca^{2+} 通道而介导抑制反应，对 Bicuculline 不敏感，其同类物 Baclofen 是此受体的有效激动剂。有研究表明，昆虫中枢神经系统存在 GABA 受体（Waldrop *et al*.，1987），其生理特性与脊椎动物 $GABA_A$ 受体类似，通过 Cl^- 通道介导抑制反应，Picrotoxin 和 Bicuculline 是有效拮抗剂，而 Muscimol 是有力的激动剂。在昆虫 *M. sexta* 的 AL 中 PN 的抑制性突触后电位（IPSP）与 Cl^- 通道有关，可被 Picrotoxin 和 Bicuculline 翻转，提示 GABA 在 AL 中是抑制性突触的神经递质；进一步的研究结果证明 GABA 受体介导了 *M. sexta* 的 AL 中 PN 的快速早期 IPSP(I_1) 相（Christensen *et al*.，1998）。*A. segetum* 雄蛾 AL 的 PN 对性信息素反应是一种双相反应模式，其兴奋相可能是 ORN 直接与 PN 形成突触所致，但抑制相则可能经由中间神经元而产生。本实验中，通过压力注射 GABA，在 MGC 中对性信息素有反应的神经元上可模拟出抑制反应，80 ms 以上 100 mmol/L GABA 压力注射入 AL 更能诱导出超极化电位；而 Bicuculline 则可抑制 PN 的超极化反应甚至翻转变成兴奋反应，这提示 PN 上有 GABA 受体，且 PN 的抑制反应与 GABA 受体激活有关，而低 Cl^- 溶液灌流实验也表明，PN 对性信息素反应的抑制相与 Cl^- 离子有关，似乎提示这种 GABA 受体也由 Cl^- 离子介导。

上述结果表明，一些 PN 可编码性信息素刺激的时间变化，这是由 ORN、LN 与 PN 组织成不同的突触结构特点而完成的。在 *A. segetum* 蛾子中，LN 可能也是 GABA 能的，PN 上表达 GABA 受体，通过 Cl^- 通道而呈现出对性信息素刺激的抑制反应。

表 1　GABA 受体拮抗剂 Bicuculline 在 AL 神经元对信息素反应中的作用

Table 1　Effect of Bicuculline on response of AL neurons to pheromone

		A	B	C
神经元自发放电频率 Frequency of neuron spontaneous spike		23 ± 11.1 (14)	52 ± 20.5*** (14)	30 ± 6.9*** (9)
第一个反应的值 Value of the first response	SN	25 ± 4.9 (12)	37 ± 9.2*** (12)	28 ± 8.3** (9)
	HP	−10.3 ± 4.55 (10)	−7.4 ± 3.86*** (10)	−9 ± 2.86* (8)
5 个反应的平均值 Average value of five responses	IDSN	4 ± 3.3 (12)	15 ± 5.2*** (12)	5 ± 5.1*** (10)
	HP	−9.4 ± 4.12 (9)	−5.5 ± 3.28*** (10)	−8.3 ± 2.64*** (9)

A：正常生理溶液（Normal saline）；B：Bicuculline 作用（Treating with Bicuculline）；C：换正常生理溶液后（After washing Bicuculline）；SN：刺激引起的去极化相内的放电数目（Spike number of depolarization by stimulating）；HP：刺激引起的超极化反应幅度（Hyperpolarization potential by stimulating）；IDSN：刺激引起抑制相内的放电数目（Spike number of inhibition duration by stimulating）。括号内数字为参与统计计算的神经元数（Figures in brackets were the neuron numbers for statistic calculating）。

* $P > 0.05$，** $P < 0.05$，*** $P < 0.01$；配对 t 检验，B 与 A 和 C 与 B 分别比较（t-test，comparing B with A and C with B）。

动 物 学 研 究 2002, Jun. 23 (3): 258～260 CN 53－1040/Q ISSN 0254－5853
Zoological Research

简报

念珠伪角毛虫小核体功能初步研究

刘小意，金立培[1]
（中山大学 生物学系，广东 广州 510275，lpjin@21cn.com）

摘要：为了研究念珠伪角毛虫的小核是否具有及具有怎样的体功能，采用显微切割手术去小核并建立无小核细胞系。经蛋白银染色鉴定，无小核细胞系群体中大多数细胞的形态结构存在缺陷：口围带的部分小膜缺损或排列紊乱，大核的数目和形态也不正常。这表明，念珠伪角毛虫的小核对于保持口围带结构的完整性以及大核的数目和形态结构的稳定性起着明确的作用。

关键词：纤毛虫；念珠伪角毛虫；小核；形态学
中图分类号：Q959.116；Q24 **文献标识码**：A **文章编号**：0254－5853(2002)03－0258－03

A Preliminary Study on Somatic Function of Micronucleus in *Pseudokeronopsis monilata*

LIU Xiao-yi, JIN Li-pei
(*Department of Biology, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China, lpjin@21cn.com*)

Abstract: To study the somatic function of the micronucleus of the ciliated protozoan *Pseudokeronopsis monilata*, amicronucleate cells were generated by removing the micronuclei shortly before binary fusion. Most of the amicronucleate cells derived from regeneration were crippled in morphology, characterized by the defective adoral zone of membranelles. At the same time, the number and the size of macronuclei in some amicronucleates become unstable. These suggest that the micronuclei play an important role for maintaining the stable structure of the cell and the macronuclei.

Key words: Ciliate; *Pseudokeronopsis monilata*; Micronucleus; Morphology

收稿日期：2001－09－30；接受日期：2001－12－25
基金项目：国家自然科学基金资助项目（39970089）
1. 通讯作者

（上接第257页）

参考文献：

Christensen T A, Hildebrand J G. 1987. Functions, organization, and physiology of the olfactory pathways in lepidopteran brain [A]. In: Gupta A P. Arthropod Brain: Its Evolution, Development, Structure and Functions [M]. New York: Wiley. 457－484.

Christensen T A, Waldrop B R, Hildebrand J G. 1998. Multitasking in the olfactory system: Context-dependent responses to odors reveal dual GABA-regulated coding mechanisms in single olfactory projection neurons [J]. *J. Neuroscience*, **18** (15): 5999－6008.

Hansson B S, Anton S. 2000. Function and morphology of the antennal lobe: New developments [J]. *Annu. Rev. Entomol.*, **45**: 203－231.

Lei H, Hansson B S. 1999. Central processing of pulsed pheromone signals by antennal lobe neurons in the male moth *Agrotis segetum* [J]. *J. Neurophysiol.*, **81**: 1113－1122.

Waldrop B, Christensen T A, Hildebrand J G. 1987. GABA-mediated synaptic inhibition of projection neurons in the antennal lobes of the sphinx moth, *Manduca sexta* [J]. *J. Comp. Physiol.*, **161**: 23－32.

Xiang H, Luo J W, Anton S, *et al*. 2001. Electrophysiological characteristics of neurons responding to sex pheromone in the antennal lobe of the male moth *Agrotis segetum* [J]. *Zool. Res.*, **22** (3): 181－186. [项 辉，罗剑文，Anton S，等. 2001. *Agrotis segetum* 雄蛾触角叶性信息素反应神经元对电刺激触角神经的反应. 动物学研究, **22** (3): 181－186.]